



VI. ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSEL HEMATOLOJİ KONGRESİ 19-21 NİSAN 2019 – GAZİANTEP NOVOTEL

Ruxolitinib multipl miyelom hücrelerinde apoptoz ve otofajiyi birlikte regüle eder

Yazarlar : Araştırma Görevlisi Bakiye Goker Bagca - Öğrenci Alican Kuşoğlu - Araştırma Görevlisi Neslihan Pınar Özateş Ay - Prof. Cumhuri Gündüz - Prof. Güray Saydam - Doç.Dr. Çığır Biray Avcı

Kurum : Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

GİRİŞ - AMAÇ

Multipl Miyelom (MM) normalde kemik iliğinde bulunan ve immün sistemin önemli regülatörleri olan plazma hücrelerinden kaynaklanan bir kanser türüdür. IL-6, VEGF, IGF, HGF, apoptotik proteinler ve NFKB genleri hastalığın patolojisini belirlemektedir. Dünya genelinde en sık rastlanan hematolojik kanser türlerinden biri olan MM tedavisinde FDA onaylı proteozom inhibitörü bortezomib kullanılmakta, fakat ilacın yan etkileri ve kanser hücrelerinin ilaca direnç göstermesi, hedefe yönelik yeni terapötik ajan ihtiyacını arttırmaktadır. JAK-STAT inhibitörü olan Ruxolitinib, myelofibrozis tedavisinde kullanılan ve FDA onaylı bir ajandır. Seçici JAK1 ve JAK2 tirozin kinaz inhibitörü olan ruxolitinibin myeloproliferatif neoplaziler üzerinde sitotoksik bir etkisi olabileceği öngörülmektedir. Bu çalışmada, ruxolitinibin MM hücre hattı üzerindeki olası sitotoksik, apoptotik ve otofajik etkilerinin araştırılması, hücrelerin gen ifade değişimlerinin kontrol hücre grubuyla karşılaştırılarak incelenmesi amaçlanmaktadır.

METOD

İnsan multipl miyelom hücre hattı ARH-77 ve insan sağlıklı B lenfosit hücre hattı NCI-BL 2171, fetal bovin serum, L-glutamin ve penisilin-streptomisin içeren RPMI-1640 besiyerinde, 37°C, %95 nem ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücre canlılığı tripan mavisi boyasıyla test edilmiştir. 1 mL DMSO'da çözülen ruxolitinibten, 10 mM'lık stok solüsyonu hazırlanmış, bu stok çalışmaya uygun konsantrasyonlara dilüe edilmiştir. Ajanın sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla, ruxolitinib hücrelere 1nM-100 uM konsantrasyon aralığında uygulanmıştır. Etken maddenin sitotoksik etkisi WST-1 testiyle 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon periyodları sonunda renk değişiminin mikropate okuyucuda belirli dalga boylarında okunmasıyla ölçülmüş, IC₅₀ dozu GraphPad Prism 5.0 yazılımıyla zaman ve doz bağımlı olarak hesaplanmıştır. Ajanın hücreler üzerindeki apoptotik etkisi Annexin V yöntemiyle, fosfolipid fosfotidilserinin membran üzerindeki translokasyonu baz alınarak incelenmiş ve akış sitometrisi yöntemiyle analiz edilmiştir. Ruxolitinibin hücreler üzerindeki otofajik etkisini analiz etmek amacıyla Premo Autophagy Tb/GFP TR-FRET



VI. ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSEL HEMATOLOJİ KONGRESİ 19-21 NİSAN 2019 – GAZİANTEP NOVOTEL

LC3B Expression Kit'i kullanılmış, otofagozom miktarının kantitasyonu gerçekleştirilmiştir. Etken maddenin IC50 dozu ile muamele edilen hücrelerden, 72 saatlik inkübasyon periyodu sonunda apoptoz ve otofaji ile ilişkili sinyal yollarındaki genlerin ekspresyon değişikliklerini incelemek amacıyla total RNA izolasyonu ve bunu takiben cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Gen ekspresyon analizi real-time PCR yöntemiyle gerçekleştirilmiş, data analizi 2- $\Delta\Delta$ Ct metoduyla yapılmıştır. Tüm deney setlerinde, ruxolitinib uygulanmayan hücreler kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

ARH77 ve NCIBL-2171 hücrelerinde ruxolitinibin IC50 dozu sırasıyla 72. saatte 20,03 uM ve 23,6 uM olarak belirlenmiştir. Ruxolitinibin IC50 dozu NCIBL-2171 ve ARH77 hücrelerinde sırasıyla 6,5 ve 2 kat apoptoz artışına neden olmuştur. Aynı doz NCIBL-2171 ve ARH77 hücrelerinde sırasıyla 1,70 ve 3,45 kat otofajik flux artışına neden olmuştur. Gen ekspresyonu analizi sonucunda otofaji ve apoptozda yer alan regülatör genlerin ekspresyon seviyelerinde anlamlı değişim belirlenmiştir.

SONUC

Elde ettiğimiz bulgular, JAK2 inhibitörü ruxolitinibin, plazma hücreli lösemi olarak da bilinen multipl miyelom hücre hattı üzerinde apoptozu ve otofajiyi eş zamanlı olarak regüle ettiğini göstermektedir. Ayrıca bu regülasyonun, kritik genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler ile desteklenmesi, etken maddenin multipl miyelom araştırmalarındaki potansiyelini ortaya koymaktadır.

Çalışmamız Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 18-TIP-014 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER

multipl miyelom, ruxolitinib, otofaji, apoptoz, IL6/STAT3 yolağı